



**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFFECTO LOCAL DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA CALIDAD
EMBRIONARIA Y FUNCIONALIDAD UTERINA DURANTE LA
GESTACIÓN TEMPRANA EN OVINOS**

Andrea Graña Baumgartner

Orientador: MSc. Victoria de Brun

Co-orientador: Dr. Alejo Menchaca

Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República

Montevideo, Uruguay
2017

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
Ciclo estral en la oveja	5
Desarrollo embrionario temprano	6
Regulación del tracto reproductivo	7
Producción y transferencia de embriones	10
Efecto local del cuerpo lúteo	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
General	13
Específicos	13
METODOLOGÍA	14
Diseño experimental	14
<i>Manejo animal y toma de muestras</i>	14
<i>Producción de embriones in vitro</i>	15
Determinaciones en plasma y tracto reproductivo	16
<i>Hormonas</i>	16
<i>Transcriptos</i>	17
Análisis estadístico	20
RESULTADOS	20
Calidad, morfología y tasas de recuperación embrionaria	20
Hormonas	21
Efectos de la lateralidad del CL sobre la expresión génica	22
DISCUSIÓN	23
Conclusiones	28
Implicancias de la tesis	28
REFERENCIAS	30

ABREVIATURAS

ADIPOR1	Receptor de Adiponectina 1
ADIPOR2	Receptor de Adiponectina 2
ADNc	Ácido desoxi-ribonucleico complementario
BACT	Betactina
CL	Cuerpo lúteo
E2	Estradiol
ER	Receptor de estrógeno
eCG	Gonadotropina coriónica equina
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
HPRT	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP	Proteína de unión al IGF
IGF1R	Receptor de IGF tipo 1
IFNt	Interferón tau
INS	Insulina
INSR	Receptor de insulina
IRMA	Ensayo inmunorradiométrico
LEP	Leptina
LEPR	Receptor de leptina
P4	Progesterona
PR	Receptor de progesterona
PBS	Solución fosfato salina
RIA	Radioinmunoanálisis
RPL19	Proteína ribosomal L19

RESUMEN

En esta tesis se presentan los resultados derivados del estudio del efecto local del cuerpo lúteo, sobre la calidad embrionaria y la funcionalidad uterina en ovinos. La hipótesis de partida de esta tesis, fue que el desarrollo embrionario se ve favorecido por el ambiente oviductal y uterino que se genera en el lado ipsilateral al cuerpo lúteo y eso se encuentra asociado a la funcionalidad del tracto reproductivo. Para ello se transfirieron 18 a 20 embriones por oviducto, ipsi y contralateral al CL, producidos *in vitro* y con un día de desarrollo luego de la fertilización (Día 0), en ovejas Corriedale. Al Día 6 se recuperaron los embriones de ambos cuernos uterinos y se colectaron muestras de útero, oviducto, fluido uterino y plasma. Se recuperó una mayor proporción de embriones, con una tendencia a presentar un desarrollo más avanzado, en el lado ipsilateral al CL. Se encontró una mayor concentración de progesterona en el oviducto ipsilateral al cuerpo lúteo, pero no se encontraron diferencias en las concentraciones uterinas de progesterona, insulina, IGF1 y leptina entre ambos cuernos. Las concentraciones de progesterona en plasma al Día 6 fueron de $0,8 \pm 0,4$ ng/mL, posiblemente indicando un predominio estrogénico en los animales de este estudio. En fluido uterino se encontró que las concentraciones de insulina fueron menores en el fluido ipsilateral al cuerpo lúteo. Asimismo, los cuernos uterinos ipsilaterales presentaron una mayor expresión génica de *ERalfa*, y tendencia a menor expresión de *IGFBP6* y *ADIPOR1*. Se concluye que existe un efecto local del cuerpo lúteo que incide sobre la calidad y desarrollo embrionario temprano, lo cual puede deberse principalmente a las acciones de la progesterona en oviducto e insulina en el fluido uterino. La mayor expresión de *ERalfa* y la tendencia a menor expresión de *ADIPOR1* en el cuerno uterino ipsilateral, puede estar asociado a la baja concentración circulante de P4 y predominio estrogénico en nuestros animales. La menor expresión de *IGFBP6* en el cuerno ipsilateral al CL podría estar asociado con un mejor desarrollo embrionario temprano.

INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva, definida como el número de corderos viables producidos anualmente por cada oveja destinada a la reproducción, es uno de los factores más importantes que afecta la eficiencia productiva en los sistemas de explotación ovina (Azzarini, 2002). A pesar de los esfuerzos y recursos volcados en el manejo reproductivo, las pérdidas por fallas en la preñez aún son considerables, de hecho, se conoce que entre un 25 y un 55% de todos los embriones mamíferos se pierden durante la gestación temprana (Niswender y Nett, 1994), y en la especie ovina hasta un 40% de las ovulaciones no se corresponden con embriones viables al Día 12 de la gestación (Ashworth, 1995). Se ha postulado que la mayor causa de mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación se debe a problemas en la señalización entre el embrión y la madre (Goff, 2002). Es así, que una sincronía estricta entre el ambiente materno y el embrión es esencial para asegurar la supervivencia embrionaria: tanto el embrión como el endometrio sintetizan y secretan a la interfase embrio-maternal una gran cantidad de proteínas, factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, que afectan a ambas partes, determinando así dicha sincronía (Martal y col., 1997).

Ciclo estral en la oveja

La función reproductiva en la hembra ovina se encuentra dominada por dos ritmos diferentes: uno anual, que es el período en el que la oveja se manifiesta receptiva desde el punto de vista reproductivo y otro ritmo que ocurre durante la estación reproductiva en períodos sucesivos cortos en forma de ciclos sexuales o estrales de 17 días aproximadamente. La oveja se muestra receptiva únicamente en un período de tiempo de 24 a 36 horas, en el celo, y en el caso de no quedar preñada repetirá todo el ciclo mientras dure el fotoperíodo corto.

Los ciclos estrales ocurren de acuerdo a una secuencia de acontecimientos endócrinos principales en los que participan varios tejidos y hormonas por ellos secretados: la hipófisis, con la hormona luteinizante (LH), la folículo-estimulante (FSH) y la oxitocina; el hipotálamo, con la hormona liberadora de

gonadotropinas (GnRH); los ovarios, secretando estrógenos (E), progesterona (P4) y oxitocina en el cuerpo lúteo (CL); y el útero, liberando prostaglandina (PG) F2 α (Goodman, 1994). La GnRH hipotalámica estimula el aumento de frecuencia de LH hipofisaria, la cual induce al desarrollo del folículo ovulatorio productor de E que permite la ovulación y la formación del CL. La P4 producida por el CL se mantiene alta durante 12-14 días determinando la fase luteal. El predominio de la P4 provoca que, al terminar dicha fase, se establezca un mecanismo de retroalimentación positivo en el cual la oxitocina hipofisaria y luteal favorecen el aumento de la secreción pulsátil de PGF2 α endometrial que por la anastomosis vena uterina-arteria ovárica -mecanismo de contracorriente- llega al ovario y ocasiona la regresión del CL o luteólisis alrededor del día 14 del ciclo sexual (acompañado de la subsiguiente caída en las concentraciones de P4). A partir de este momento comienza nuevamente el predominio estrogénico durante 2-3 días, determinando la fase folicular del ciclo sexual. De esta forma, la oveja retorna al celo completando su ciclo estral de 17 días (Goodman, 1994). Sin embargo, si luego de la ovulación se produce la fertilización, el interferón tau (IFN τ), secretado por el embrión a partir del Día 10 (con máxima expresión al Día 14) luego de la fecundación, inhibe la liberación pulsátil de PGF2 α a través de la inhibición de la expresión de receptores de oxitocina, imposibilitando que ocurra la luteólisis (reconocimiento materno), promoviendo de esta manera el desarrollo embrionario (Spencer y col., 2004a).

Desarrollo embrionario temprano

Tras la fertilización, el embrión sufre sus primeras divisiones celulares en el oviducto y alcanza el útero como mórula alrededor del día 4-5 post-celo, en el ovino (Spencer y col., 2004b). En este corto tiempo, varios cambios morfológicos y bioquímicos se producen y son afectados por el entorno del embrión. Hacia el Día 6 se forma el blastocisto por compactación de la mórula y entrada de líquido extracelular tras lo cual se forma una cavidad rodeada por células trofoblásticas. El blastocisto, en su forma esférica, eclosiona de la zona pelúcida en los días 7 a 8 (Spencer y col., 2004). Hacia el Día 11 va adoptando una forma tubular y luego se elonga convirtiéndose en un embrión filamentoso entre los días 12 y 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Entre los días 10-12 de gestación, comienza la secreción de interferón tau embrionario, que

provoca cambios en el endometrio determinando el destino del CL (luteólisis o mantenimiento del CL: reconocimiento materno de la preñez al Día 14, en ovinos). La elongación del blastocisto marca el comienzo de la implantación, aunque la adhesión firme al endometrio en ovinos no ocurre hasta el Día 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Sin embargo, el destino del embrión se decide antes de la implantación y es allí donde hay una alta incidencia de mortalidad embrionaria (Roche y col., 1981; Goff, 2002). El IFN γ estimula varios genes endometriales y secreción de hormonas al fluido uterino para asegurar la receptividad uterina a la implantación.

Regulación del tracto reproductivo

El fluido existente en la luz del tracto reproductivo es un medio complejo formado por trasudado de la sangre y por secreción activa de las células epiteliales (Walker y col., 1996). En el oviducto, el producto de secreción más abundante es un grupo de glicoproteínas de alto peso molecular, específico del oviducto, aunque también se secretan factores de crecimiento y citoquinas. Las glicoproteínas se unen a la zona pelúcida y a las membranas de los gametos y son muy importantes para la capacitación, motilidad y viabilidad espermáticas y para el correcto desarrollo embrionario temprano (Murray, 1995; Leese y col., 2001; Buhi, 2002). Se ha demostrado que su secreción está regida por ambas hormonas esteroideas, siendo aumentada por los E y disminuida por la P4 (Murray, 1995; Buhi, 2002). Esto asegura una sincronización con la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Los esteroides ováricos también pueden regular la composición de las secreciones, ya que el fluido del oviducto de la fase folicular tiene distintos efectos sobre la capacidad y motilidad de los espermatozoides y la penetrabilidad de los oocitos (Killian, 2004). También se encuentran presentes en el fluido del oviducto factores embriotróficos y mitogénicos, como los factores de crecimiento, en cantidades variables (Gandolfi y col., 1989). Potencialmente, estos factores actúan de manera autócrina o parácrina para regular la función del oviducto y/o el desarrollo embrionario (Buhi y col., 1997). El endometrio también pasa por una serie de transformaciones cíclicas en respuesta a la fluctuación de los niveles sanguíneos de las hormonas ováricas (Hafez y Tsutsumi, 1996). Los E producen un notable crecimiento uterino. Durante la fase folicular, las glándulas

aumentan su tamaño, penetran profundamente en el estroma y comienzan a enrollarse, pero su capacidad secretoria plena se da bajo la influencia de la P4 (Niswender y Nett, 1994). La P4 actúa en el útero asegurando su quiescencia, estimulando y manteniendo las funciones secretorias endometriales esenciales para el desarrollo temprano del embrión, implantación, placentación y un correcto desarrollo feto-placentario hasta el término de la gestación (Graham y Clarke, 1997).

Durante la última década se han acumulado numerosas evidencias sobre la participación de muchas hormonas y factores de crecimiento que determinan la viabilidad futura del embrión (Kaye, 1997). Las hormonas metabólicas como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1), insulina, leptina y adiponectina, presentan además de un rol central, en el eje hipotálamo-hipófisis, un efecto directo en el útero durante la preñez temprana que pueden afectar la comunicación embrio-maternal (Downing y col., 1995; Keller y col., 1998; Wathes y col., 1998; Kawamura y col., 2002; Moschos y col., 2002). Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La familia IGF está integrada por IGF1 e IGF2 que son sintetizados principalmente en el hígado, pero también pueden ser sintetizados localmente en el útero por lo que pueden actuar de forma endócrina, parácrina y autócrina (Thissen y col., 1994). La actividad y niveles de los IGFs está modulada por al menos seis proteínas de unión a IGF (IGFBPs) y por enzimas proteolíticas (BP-Pr) que modulan tanto a las IGFs como las IGFBP. En el tracto reproductivo ovino se ha demostrado la expresión del ARNm de *IGF1*, *IGF2* y sus receptores, y algunas de las IGFBPs (Stevenson y col., 1994; Stevenson y Wathes, 1996; Reynolds y col., 1997). Además de estimular la proliferación y diferenciación uterina, ambos IGFs estimulan el desarrollo de los embriones durante la pre-implantación, actúan en el desarrollo fetal y controlan el desarrollo placentario (Keller y col., 1998; Wathes y col., 1998). Asimismo, se ha observado que además de los múltiples efectos de la insulina en el metabolismo, ésta presenta un importante rol en la regulación del crecimiento embrionario durante la preimplantación, promoviendo la proliferación celular y la diferenciación morfológica de

embriones, ya que se ha descrito la presencia de receptores de insulina tanto en el endometrio como en el embrión (Harvey y Kaye, 1990, Gardner y Kaye, 1991). Por otro lado, las adipocinas también presentan un papel fundamental en el desarrollo. Entre ellas se encuentra la leptina, péptido sintetizado principalmente por el tejido adiposo, aunque también se expresa en otros tejidos como el hígado, páncreas y tracto reproductivo (González y col., 2000; Chilliard y col., 2005). Esta hormona se asoció en un principio con el control central del apetito, pero con el tiempo se ha demostrado que está implicada en múltiples procesos fisiológicos, tales como la inflamación, la hematopoyesis, la actividad inmune y la reproducción (Moschos y col., 2002). Los receptores de leptina (LEPR) han sido localizados en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y en el tracto reproductivo, vinculando así, indiscutiblemente, a la leptina con la reproducción (Moschos y col., 2002). La síntesis de leptina y de su receptor ha sido demostrada en el endometrio de mujeres, bovinos (González y col., 2000; Kawamura y col., 2002) y ovinos (Sosa y col., 2010), y además en ratas, se demostró que la leptina añadida al medio de cultivo promueve el crecimiento del embrión en la etapa de pre-implantación (Kawamura y col., 2002). Si bien ya hace 20 años de la existencia de la primera evidencia de una proteína altamente expresada por los adipocitos denominada adiponectina (Scherer y col., 1995) y de la abundante literatura reciente de su rol en la reproducción, hay muy escasa información respecto del rol de adiponectina en ovinos (Kasimanickam y Kasimanickam, 2011). Se han identificado dos tipos de receptores de adiponectina ADIPOR1 y ADIPOR2, con funciones diferentes (Hug y col., 2004; Yamauchi y col., 2007). Estos receptores se han reportado en diversos tejidos periféricos como placenta (Caminos y col., 2005), ovario (Michalakis y Segars, 2010), y recientemente se ha demostrado la presencia de estos receptores en el útero ovino durante la preñez temprana (Sequeira y col., 2016), lo que vincula claramente a la adiponectina con la reproducción.

Un ambiente perturbado a causa de una secreción irregular de estas hormonas puede no afectar al embrión inmediatamente, pero comprometer su desarrollo en etapas posteriores (Leese, 2005): la mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación tardía (en útero) puede haberse determinado en etapas anteriores (en oviducto).

Es así que *analizar el ambiente materno donde el embrión está desarrollándose es relevante para detectar cambios inducidos por el embrión.*

Producción y transferencia de embriones

La producción de embriones *in vitro*, en conjunto con las técnicas de criopreservación son esenciales para incrementar la productividad en ovejas (Paramio, 2010). El uso extensivo de la producción de embriones *in vitro* permite un gran número de embriones para multiplicar una hembra en programas de mejora genética, pero también es de suma utilidad para la investigación. Esto ha tenido un efecto significativo en la acumulación del conocimiento biológico de la maduración del ovocito, fertilización y desarrollo embrionario temprano en diversas especies. Estos procesos adquieren especial importancia para las tecnologías reproductivas, en las que hay altas tasas de pérdidas embrionarias. La transferencia de embriones nos permite seleccionar a las hembras con mejores características productivas para lograr un progreso genético más rápido, la oportunidad de introducir nuevo material genético en las poblaciones, o reducir el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas. En humanos, es el principal tratamiento para la esterilidad cuando otros métodos de reproducción asistida no han tenido éxito, sin embargo, en esta especie se ha reportado que la tasa de embarazo es del 38% y las fallas en implantación han sido atribuidas a un endometrio no receptivo (Norwitz y col., 2001). *Es así que investigar sobre el ambiente uterino y oviductal es relevante, ya que este conocimiento puede ayudar a mejorar los índices de las técnicas reproductivas.*

Los rumiantes presentan algunas características reproductivas muy similares con los humanos, ya que los blastocistos son de tamaño similar (120-140 μ m de diámetro), y además los embriones de ambas especies presentan activación del genoma embrionario en estadíos similares de desarrollo. Por estos motivos, los ovinos son un excelente modelo para estudiar el desarrollo embrionario en humanos, suplantando al ratón cuyo desarrollo embrionario ocurre más rápido (Niemann y Wrenzycki, 2000). Esto cobra importancia debido a la dificultad para realizar investigación o experimentación con embriones humanos, con

importantes restricciones en algunos países como Uruguay donde es ilegal (Ley N° 19167) a diferencia de otros países.

Efecto local del cuerpo lúteo

del Campo y col., (1977) realizaron un estudio en bovinos, donde transfirieron embriones a los cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL, y demostraron que el lugar donde se transfieren los embriones respecto al CL impacta en el desarrollo y supervivencia embrionaria. Es así, que además de los aspectos que evidencian la interacción embrio-maternal, el lugar del cuerno uterino respecto a la posición del cuerpo lúteo (CL) donde se desarrolla el embrión parece ser importante. Si bien la P4 circula de forma sistémica, se ha reportado en ovinos que puede pasar de la vena a la arteria ovárica por un mecanismo de contracorriente (Einer-Jensen y McCracken, 1981), y así alcanzar directamente al oviducto y al útero (Hunter y Southey, 1987). Esto resulta en un gradiente de P4 a lo largo del tracto reproductivo: es decir, la región más cercana al CL presenta una concentración mayor de P4 (Weems y col., 1989), pudiendo influenciar el desarrollo embrionario temprano de forma diferencial acorde a la localización del embrión en el tracto reproductivo (ipsi o contralateral al CL). Se ha reportado en ovinos que a los 5 días luego del estro o preñez, la expresión oviductal de *PR*, *ERalfa* e *IGF2* es menor en el lado ipsilateral en relación al contralateral al CL (Sosa y col., 2006; de Brun y col., 2013, respectivamente), lo que refiere probablemente a un ambiente hormonal diferente, establecido por la distribución local de productos ováricos al tracto reproductivo (Einer-Jensen y McCracken, 1981; Weems y col., 1989; Wijayagunawardane y col., 1997). Estos cambios en expresión génica pueden ser importantes para la modulación de la secreción uterina, actuando directamente o interaccionando con otros genes expresados de manera diferente en los cuernos uterinos ipsilateral y contralateral al CL (Bauersachs y col., 2003). Teniendo esto en cuenta, es posible que el efecto local del CL no sólo se limite a la acción de la progesterona secretada por el CL luego de la ovulación, ya que el mismo mecanismo se podría plantear para la acción del estradiol secretado por el folículo ovulatorio, y otras hormonas que se sintetizan *in situ* en el útero.

Es importante remarcar que, si bien estos hallazgos están establecidos desde hace tiempo, *hay escasa información respecto a la funcionalidad del tracto*

reproductivo acorde a la posición del CL. Más aún, si bien existe abundante información acerca de la expresión génica uterina en rumiantes y su regulación, se desconoce la importancia del efecto local del cuerpo lúteo sobre la regulación de la expresión génica en útero.

La realización de este experimento en ovinos se plantea como un modelo para estudiar retrasos en el desarrollo embrionario y los factores maternos que impactan sobre el mismo, transfiriendo embriones en oviductos ipsi y contralateral al CL.

HIPÓTESIS

El desarrollo embrionario se ve favorecido por el ambiente oviductal y uterino que se genera del lado ipsilateral al cuerpo lúteo y esto está asociado a la funcionalidad del tracto reproductivo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del lado de la ovulación sobre el tracto reproductivo y el embrión durante las primeras etapas de desarrollo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar:

1. La calidad, morfología y tasas de recuperación de embriones de Día 6, transferidos al Día 1 de desarrollo al oviducto ipsi y contralateral al cuerpo lúteo.
2. Las concentraciones hormonales al Día 6 y los efectos de la lateralidad del cuerpo lúteo sobre P4, IGF1, insulina y leptina en plasma, fluido uterino y útero, y la concentración de P4 en oviducto.
3. Los efectos de la lateralidad del cuerpo lúteo sobre la expresión génica, en cuernos uterinos ipsi y contralateral al cuerpo lúteo al Día 6 luego de la ovulación.

Si bien esta tesis se ha focalizado principalmente en el efecto local del cuerpo lúteo, debido a que las muestras obtenidas fueron al Día 6 de desarrollo, no descartamos que los cambios encontrados en este trabajo también se deban a otros procesos fisiológicos que ocurren en el ovario, como la acción del folículo preovulatorio durante el proestro o la ovulación.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

Manejo animal y toma de muestras

Este experimento se realizó en la Fundación IRAUy en Montevideo, el Institut Pasteur de Montevideo y el Campo Experimental N° 1 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Migueles, Canelones (Ruta 108, Km 11,91). El experimento fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria (Exp- 111130-001236/14).

La estrategia de investigación planteada implicó la producción de embriones *in vitro* para transferirlos al Día 1 en cantidades iguales a oviductos ipsi y contralateral al cuerpo lúteo. Los embriones fueron colectados al Día 6 cuando fueron evaluados. La funcionalidad del tracto reproductivo fue evaluada al Día 6 en términos de concentración de P4 en oviducto, concentración de P4, IGF1 insulina y leptina en útero y fluido uterino, y expresión génica en los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL.

Se utilizaron 50 ovejas Corriedale multíparas con un peso de $57,7 \pm 4,4$ kg y una condición corporal de $3,3 \pm 0,4$ (en una escala de 0 a 5). Para sincronizar los celos se utilizó un tratamiento de 7 días con esponjas intravaginales impregnadas con medroxiprogesterona (Progespon, Syntex S.A., Bs As, Argentina), de acuerdo a Menchaca y Rubianes., (2004), al cabo del cual se administraron 200 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG, Novormon 5000, Syntex S.A.) y una dosis luteolítica de PGF2alfa (Cloprostenol sódico 125 µg, Ciclase DL, Syntex S.A.) por vía intramuscular. Los estros fueron detectados cada 12 horas mediante el uso de machos androgenizados y se seleccionaron aquellas ovejas (n=12) que manifestaron estro de manera sincronizada y presentaron un solo cuerpo hemorrágico determinado por laparoscopia al momento de la transferencia. El día previo a la transferencia de embriones, los animales permanecieron sin acceso a comida o agua. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos con heparina al Día 6 de desarrollo (previo a la colecta de embriones), y se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 g, y se almacenó el plasma a -20°C hasta su análisis.

Para la transferencia embrionaria se produjeron embriones *in vitro* (metodología explicada más adelante en esta sección), y se transfirieron entre 18 y 20 embriones por oviducto (ipsi y contralateral al CL; 38 a 40 embriones por oveja), al Día 1 de desarrollo embrionario. El Día 0 para los embriones fue definido como el día en que se inició la fertilización *in vitro*, lo que coincidió con el día del estro en las receptoras. La transferencia fue realizada por el oviducto mediante una técnica quirúrgica y al Día 6 se sacrificaron las ovejas para obtener el tracto reproductivo y se realizaron los lavados de los cuernos uterinos para coleccionar los embriones en sentido retrogrado desde la porción craneal a caudal de cada cuerno. En una primera instancia se lavó el cuerno uterino ipsilateral con 2 mL de suero fisiológico para analizar el fluido uterino. Posteriormente se realizó un lavado con 20mL para coleccionar todos los embriones provenientes del cuerno uterino ipsilateral en placa de petri. El mismo procedimiento fue aplicado para el cuerno uterino contralateral al CL. Los embriones fueron evaluados y clasificados morfológicamente de acuerdo a las normas de la IETS (2010). Entre los parámetros a ser evaluados se incluyeron las tasas de recuperación, la proporción de blastocistos y mórulas en ambos cuernos y la proporción de embriones degenerados.

Una vez coleccionados los embriones, también se coleccionaron los oviductos y una porción del tercio superior de los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL. Parte del tejido se utilizó para la determinación de hormonas en útero y oviducto, y otra porción de los cuernos uterinos fue congelada en N₂ líquido y almacenada a -80°C hasta su procesamiento para estudios de expresión génica.

Producción de embriones *in vitro*

Todos los procedimientos de laboratorio que correspondan con la producción de embriones, se realizaron en el Instituto de Reproducción Animal Uruguay (Fundación IRAUy) e Institut Pasteur de Montevideo. Los embriones se produjeron de acuerdo a la técnica descrita por Menchaca y col., (2016). Se coleccionaron ovarios del Frigorífico San Jacinto – NIREA S.A. (Ruta 7 Km 59,500, San Jacinto, Canelones), los cuales fueron transportados en un recipiente con PBS a 37°C de temperatura, para mantener viables los ovocitos. Para extraer

los ovocitos se realizó una punción de los folículos, mediante la utilización de una jeringa de 5mL con medio de recuperación con HEPES. Una vez finalizada la punción de los folículos de todos los ovarios colectados, se procedió a la búsqueda y clasificación de los complejos cúmulo-ovocitos (COCs), mediante una lupa estereoscópica. Los COCs obtenidos de la punción de los ovarios se dejaron madurando entre 18 y 24 horas, para luego proceder con la fertilización *in vitro* (FIV), con medio SOF (de su sigla en inglés Synthetic Oviductal Fluid), utilizando semen ovino congelado. En el Día 1 del desarrollo embrionario, los embriones fueron transportados al campo experimental en Migues para ser transferidos a las ovejas.

Determinaciones en plasma y tracto reproductivo

Las determinaciones hormonales y expresión génica se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de República, Uruguay.

Hormonas

Se determinaron las concentraciones hormonales de P4, IGF1, leptina e insulina en plasma, fluido uterino y en útero, acorde a Rodnight y col., (1988). También se determinó la concentración de P4 en oviducto.

Las hormonas en fluido uterino, plasma, útero y oviducto fueron analizadas por radioinmunoanálisis (RIA).

Para el contenido endometrial, aproximadamente unos 500 mg de tejido uterino fue trozado y homogenizado con buffer isotónico, mediante la utilización de un homogeneizador de tejidos (PRO200) a 9500-13500 rpm por 45 segundos (Sosa y col., 2009). Para el análisis de P4 en oviducto, se maceró el tejido completo de forma de homogenizar la muestra y luego se seleccionaron entre 300 y 500 mg de tejido para la extracción de P4. Para las hormonas IGF1, insulina y leptina se utilizó el sobrenadante obtenido de la centrifugación del tejido para la realización del RIA. Sin embargo, para P4, se realizaron cuatro extracciones sucesivas con éter y luego se resuspendieron con 300 uL de buffer para el análisis por RIA. Las concentraciones de P4, IGF1, insulina y

leptina medidas en útero fueron expresadas en relación a los gramos de tejido utilizado en la maceración.

Las concentraciones de progesterona se determinaron por RIA en fase sólida utilizando kits comerciales (MP Biomedicals, Diagnostics, Santa Ana, CA, USA), según Sosa y col., (2006). La sensibilidad del ensayo en plasma, útero y oviducto para P4 fue de 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL y 0,04 ng/mL, respectivamente. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo para plasma (0,6 ng/mL), útero (0,2 ng/mL) y oviducto (1,1 ng/mL) fueron de 16,3%, 12,9% y 12,1% respectivamente. Las concentraciones de P4 no fueron detectadas en fluido uterino por RIA.

Las concentraciones de IGF1 e insulina se determinaron por IRMA en fase sólida, utilizando kits comerciales (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA) según Sosa y col., (2009) y Fernández-Foren y col., (2011). Para IGF1, la sensibilidad del ensayo en plasma, útero y fluido uterino fue de 1,2 ng/mL, 0,5 ng/mL y 0,4 ng/mL, respectivamente. Los CV intraensayo para plasma (17,2 ng/mL), útero (50,6 ng/mL) y fluido uterino (47,6 ng/mL) fueron de 18,2%, 7,6% y 11,6% respectivamente.

Para insulina, la sensibilidad del ensayo en plasma y fluido uterino fue de 1,3 μ UI/mL y en útero fue de 4,3 μ UI/mL. Los CV intraensayo para plasma (18,7 μ UI/mL), útero (17,1 μ UI/mL) y fluido uterino (18,7 μ UI/mL) fueron de 6%, 10,3% y 6% respectivamente.

Las concentraciones de leptina se determinaron según lo descrito por Raddatz y col., (2008). La sensibilidad del ensayo en útero fue de 2,9 ng/mL. El CV intraensayo (14,2 ng/mL) fue de 15,5%. Las concentraciones de leptina no fueron detectadas en fluido uterino por RIA.

Transcriptos

En el endometrio se determinaron transcriptos de *ERalfa*, *PR*, *IGF1*, *IGF1-R*, *INSR*, *LEPR*, *IGFBP2-6*, *ADIPOR1* y 2.

Se extrajo ARN total de útero utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguido de precipitación con cloruro de litio y tratamiento con DNAsa utilizando un kit DNA-freeTM (Invitrogen). Para cada muestra, se sintetizó ADN copia (ADNc) mediante transcripción reversa usando una transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con primers oligo-dT y 1ug de ARN total como molde.

Se determinó la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR), utilizando el equipo Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). La eficiencia (E) de los ensayos fue calculada acorde a la fórmula $E=(10^{-1/\text{pendiente}}-1)$ según Rutledge y Cote., (2003). La expresión génica fue medida por cuantificación relativa al control exógeno según Pfaffl, (2009) y normalizada a la media geométrica de los genes de control endógeno, tomando en consideración las eficiencias de amplificación respectivas.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de los primers utilizados para la cuantificación relativa del ADNc en el tejido.

Gen ¹	Código de acceso ²	Secuencia del primer	Largo (pb)	Eficiencia	Fuente
HPRT	XM_590802	F TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG R CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	1,08	(Carriquiry y col., 2009)
RPL19	NM_001040516.1	F CCCCAATGAGACCAATGAAATC R CTGGAGACCCCTTCTGAG	119	1,05	(Chen y col., 2006)
BACT	U08283	FCGAGCACCGATGAAGATCAAGTT R CCTCCGATCCACACCGAGTA	64	1,37	(Chen y col., 2006)
PR	Z66555	F GACAGCACTTTCTAGGCGACAT R TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	1,21	(Sosa y col., 2009)
ER	AY033393	F AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC R CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT	234	1,10	(Sosa y col., 2009)
IGF1	NM_001009774.3	F TTGCACTTCAGAAGCAATGG R ACTGGAGAGCATCCACCAAC	209	0,87	(De Brun y col., 2015)
IGF1R	NM_001244612.1	F GACCATCAAAGCTGGGAAAA R TTATGTCCCTTTGCTCTGG	116	0,87	(De Brun y col., 2015)
IGF2	NM_001009311.1	F ACCCTCCAGTTTGTCTGTGG R GGGGTATGCTGTGAAGTCGT	210	1,15	(De Brun y col., 2015)
IGFBP2	NM_174555.1	F ATGCGCCTTCCGGATGA R GTTGACAGGCCATGCTTGTC	74	1,07	(Astessiano y col., 2012)
IGFBP3	AF305199.1	F AGCACAGACCCAGAACTTCT R TTCAGCGTGTCTCCATTTC	86	1,12	(Pinotti y Rosi, 2006)
IGFBP4	S77394.1	F ATGTGCCTGATGGAGAAAGG R AAGGCAGAGCCACAGACAGT	98	0,82	(De Brun y col., 2015)
IGFBP5	NM_001129733.1	F GGTTTGCTGAACGAAAAGA R CTGGGTCAGCTTCTTCTGC	193	0,81	(De Brun y col., 2015)
IGFBP6	AY197339	F GGAGAGAATCCAAGGAGAGTAA R GAGTGGTAGAGGTCCCGAGT	100	1,20	(Fenwick y col., 2008)
INSR	XM:004008038.1	F TGGCTCCTACAGCTGGACAGT R TCAGCACCCAGGATGGTT	86	0,77	(De Brun y col., 2015)
LEPR	NM_001009763.1	F CAGCGGTTGGGTCTAACATT R GCAGCAGTACACTGCGTCAT	215	1,04	(De Brun y col., 2015)
ADIPOR1	NM_001034055.1	F GGCTCTACTACTCTTCTAC R ACACCCTGCTCTTGCTG	154	0,65	(De Brun y col., 2015)
ADIPOR2	NM_001040499.2	F GGCAACATCTGGACACATC R CTGGAGACCCCTTCTGAG	203	1,12	(De Brun y col., 2015)

¹HPRT = Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa, RPL19 = Proteína ribosomal L19, BACT = Betactina, PR = Receptor de progesterona, ER = Receptor de estrógenos, IGF1 = Factor de crecimiento similar a la insulina 1, IGF1R = Receptor de IGF tipo 1, IGF2 = Factor similar a la insulina tipo 2, IGFBP2 = Proteína de unión 2-IGF, IGFBP3 = Proteína de unión 3-IGF, IGFBP4 = Proteína de unión 4-IGF, IGFBP5 = Proteína de unión 5-IGF, IGFBP6 = Proteína de unión 6-IGF, INSR = Receptor de insulina, LEPR = Receptor de leptina, ADIPOR1 = Receptor de adiponectina 1, ADIPOR2 = Receptor de adiponectina 2.

²Secuencias ovinas de GeneBank

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1989), con el procedimiento proc mixed para todas las variables. El nivel de probabilidad de significancia estadística se fijó en $P < 0,05$, y $P < 0,1$ para tendencia.

Para el análisis de la concentración hormonal en el fluido uterino, útero y oviducto se incluyeron en el modelo estadístico el lado ipsi o contralateral al CL.

Todos los transcritos determinados por PCR en tiempo real se analizaron por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, lo que implica normalización a un control endógeno (housekeeping) ($\Delta C_t = C_t \text{ gen diana} - C_t \text{ housekeeping}$) (Livak y Schmittgen, 2001), se incluye en el modelo el lado ipsi o contralateral al CL.

RESULTADOS

Calidad, morfología y tasas de recuperación embrionaria

Al momento de la colecta, se recuperó una mayor proporción de embriones en el lado ipsilateral respecto al lado contralateral al CL (Tabla 2). Asimismo, al evaluar la morfología de los embriones recuperados de ambos cuernos, se observó que los embriones transferidos al oviducto ipsilateral tendieron a presentar más blastocistos (un 10% más) sobre el total de estructuras recuperadas, en relación a los embriones transferidos al lado contralateral al CL (Tabla 2). En el mismo sentido, los embriones colectados en el cuerno uterino contralateral al cuerpo lúteo, presentaron una mayor proporción de embriones degenerados (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de recuperación (estructuras recuperadas/embriones transferidos), desarrollo embrionario (proporción de blastocitos/estructuras recuperadas) y proporción de embriones degenerados obtenidos de la transferencia de embriones producidos *in vitro*, al oviducto ipsi y contralateral al CL.

	Ipsilateral	Contralateral	P valor
Tasa de recuperación	43,6% (109/250)	30,1% (75/249)	<0,05
Desarrollo embrionario	23,8% (26/109)	14,7% (11/75)	0,15
Embriones degenerados	22,9% (25/109)	42,7% (32/75)	<0,05

Hormonas

Se analizaron las concentraciones hormonales en plasma, fluido uterino y útero de P4, IGF1, insulina y leptina. También se analizaron las concentraciones de progesterona en oviducto.

En oviducto, las concentraciones de P4 fueron mayores en el lado ipsilateral respecto al contralateral al CL: $57,3 \pm 15,1$ vs. $11,6 \pm 4,8$ ng/g de tejido; $p < 0,001$). Sin embargo, en útero las concentraciones de P4 no alcanzaron diferencias significativas entre los cuernos ipsi y contralateral al CL: $8,4 \pm 1,7$ vs. $6,7 \pm 1,6$ ng/g de tejido, respectivamente. La concentración plasmática de P4 al momento de la colecta de embriones (Día 6) fue de $0,8 \pm 0,4$ ng/mL.

En el fluido uterino, se encontraron menores concentraciones de insulina en el cuerno ipsilateral respecto al contralateral al CL: $3,9 \pm 0,3$ vs. $4,6 \pm 0,2$ μ UI/mL; $p = 0,05$. Sin embargo, la lateralidad de los cuernos uterinos respecto al CL no afectó las concentraciones de insulina en el útero ($35,1 \pm 3,0$ vs. $29,6 \pm 3,0$ μ UI/g). La concentración de insulina en plasma al Día 6 de desarrollo embrionario fue de $20,7 \pm 6,6$ μ UI/mL.

La localización de los cuernos uterinos respecto al CL no afectó las concentraciones de IGF1 en el útero ($157,7 \pm 13,7$ vs. $135,5 \pm 14,4$ ng/g), como tampoco en el fluido uterino ($1,6 \pm 0,3$ vs. $1,7 \pm 0,3$ ng/mL). La concentración plasmática de IGF1 al momento de la colecta fue de $274,5 \pm 62,5$ ng/mL.

No hubo un efecto local del CL sobre las concentraciones de leptina en útero ($66,8 \pm 9,7$ vs. $73,0 \pm 10,6$ ng/g).

Efectos de la lateralidad del CL sobre la expresión génica uterina

La localización de los cuernos uterinos respecto al CL modificó la expresión génica de *ERalfa*, *IGFBP6* y *ADIPOR1*. El cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo presentó más cantidad de ARNm de *ERalfa* y tendió a presentar menos ARNm de *IGFBP6* y *ADIPOR1*, en relación al cuerno uterino contralateral (Tabla 3). No se encontraron diferencias para ninguno de los otros genes medidos (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de la lateralidad del cuerpo lúteo (Ipsilateral o Contralateral) sobre la expresión génica uterina.

Gen	Ipsilateral	Contralateral	P valor
PR	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	NS
ERalfa	$1,3 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,3$	0,05
IGF1	$0,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$	NS
IGF1R	$1,4 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	NS
IGF2	$1,1 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	NS
IGFBP2	$0,7 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	NS
IGFBP3	$0,8 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$	NS
IGFBP4	$0,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$	NS
IGFBP5	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	NS
IGFBP6	$1,8 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,6$	0,1
INSR	$1,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	NS
LEPR	$0,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$	NS
ADIPOR1	$0,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$	0,1
ADIPOR2	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	NS

¹HPRT = Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa, RPL19 = Proteína ribosomal L19, BACT = Betactina, PR = Receptor de progesterona, ERalfa = Receptor de estrógenos, IGF1 = Factor de crecimiento similar a la insulina 1, IGF1R = Receptor de IGF tipo 1, IGF2 = Factor similar a la insulina tipo 2, IGFBP2 = Proteína de unión 2-IGF, IGFBP3 = Proteína de unión 3-IGF, IGFBP4 = Proteína de unión 4-IGF, IGFBP5 = Proteína de unión 5-IGF, IGFBP6 = Proteína de unión 6-IGF, INSR = Receptor de insulina, LEPR = Receptor de leptina, ADIPOR1 = Receptor de adiponectina 1, ADIPOR2 = Receptor de adiponectina 2.

DISCUSIÓN

Hasta donde conocemos, este es el primer trabajo en el que se realizaron transferencias embrionarias de manera simultánea al oviducto ipsi y contralateral al CL para evaluar el efecto sobre el desarrollo embrionario y la funcionalidad oviductal y uterina en ovinos. Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio, fue que la calidad y desarrollo embrionario temprano es afectado por la acción local del CL. Encontramos que embriones transferidos al oviducto ipsilateral al CL presentaron una mayor tasa de recuperación y tendencia a mayor desarrollo embrionario, respecto a embriones transferidos al oviducto contralateral al CL. Si bien tampoco hay muchos estudios en rumiantes que hayan realizado transferencias simultáneas en útero, previamente, del Campo y col., (1977) realizaron un estudio en bovinos, donde transfirieron embriones al Día 6 a los cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL, y una vez recuperados al Día 24, observaron que cuando los embriones se transfieren del lado ipsilateral mejora el desarrollo y supervivencia embrionaria. Estos autores sugieren que la mejor tasa de preñez encontrada en el cuerno uterino ipsilateral, estaría vinculada al reconocimiento materno de la preñez. El mecanismo de contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica que permite el pasaje de PGF2alfa hacia el ovario, desencadenando la luteólisis al Día 14 en ovinos, y el bloqueo de este mecanismo por el embrión del lado ipsilateral al CL permitiendo el reconocimiento materno de la gestación, es bien conocido en rumiantes (Bonnin y col., 1999; Spencer y col., 2007; Bazer, 2013). Sin embargo, en este estudio la colecta de embriones se realizó al Día 6, mucho antes de que tenga lugar el mecanismo de reconocimiento materno. Nuestro hallazgo está vinculado a un efecto local del ovario (sea el folículo preovulatorio y/o el CL recientemente formado) sobre el embrión mientras transita por el oviducto y ni bien llega al útero.

Las mayores tasas de recuperación de embriones encontradas en el cuerno uterino ipsi respecto al contralateral pueden ser consecuencia de un gradiente de concentración de progesterona que existe a lo largo del tracto reproductivo, donde la región oviductal o uterina más cercana al lado de la ovulación,

presenta mayores concentraciones de progesterona, como ha sido reportado previamente por Weems y col., (1989) en ovinos. De hecho, en este trabajo encontramos que la concentración de P4 en oviducto fue casi 4 veces mayor en el lado ipsi respecto al contralateral al CL. Se conoce que la P4 tiene la habilidad de modificar la relación embrio-maternal estimulando los cambios en el estado fisiológico del oviducto para influir sobre la sobrevivencia embrionaria y activación del genoma embrionario (Lawson y Cahill, 1983, Maillo y col., 2016). Por tanto, se sugiere que la mayor tasa de recuperación y tendencia a presentar mayor porcentaje de blastocistos en el lado ipsilateral respecto al contralateral, se debe principalmente a las acciones de la P4 en el oviducto.

La concentración de P4 no fue diferente entre los cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL. Asimismo, se observó que los niveles de P4 en útero fueron menores respecto a lo que ha sido reportado previamente para los días 4-6 del ciclo, en ambos cuernos uterinos (Weems y col., 1989; Takahashi y col., 2016). Por ejemplo, Takahashi y col., (2016) reportaron niveles de P4 de 32,6 vs. 15,9 ng/g de tejido, para cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL al Día 6 del ciclo, respectivamente, 4 veces más que lo encontrado en este estudio. Se conoce que las concentraciones de P4, secretadas por el CL, son más bajas durante los primeros días del ciclo, y se incrementan a medida que transcurre la fase luteal (e.j.: al Día 4 hay casi dos veces menos P4 en útero respecto al Día 9 del ciclo; Weems y col., 1989). Es así, que podemos sugerir que la menor concentración de P4 en útero al Día 6 respecto a lo reportado previamente, puede ser indicativo de un útero retrasado en los animales de este estudio.

Estos niveles uterinos de progesterona por debajo de lo reportado para Día 6 (Takahashi y col., 2016), probablemente sean reflejo de las bajas concentraciones plasmáticas de P4 encontradas en nuestros animales respecto de numerosos reportes (Smith y col., 1975; Viñoles y col., 2003; Crowe y Mullen, 2013). No encontramos una explicación obvia para estos niveles subluteales de P4 en plasma el día 6 del ciclo estral, pero podrían ser consecuencia de una respuesta inflamatoria aguda desencadenada a partir la manipulación durante la transferencia embrionaria, provocando efectos en el CL y afectando así la producción y niveles de progesterona circulante. De hecho, se ha observado que una respuesta inflamatoria aguda debido a un daño local puede tardar hasta 5 días en resolverse (Kohl y Deutschman, 2006).

Tampoco deberían descartarse otros factores vinculados a la dificultad de la propia técnica al colocar los embriones en la profundidad del oviducto, o la cantidad de embriones colocados por oviducto (20 aproximadamente). Por otro lado, las concentraciones de P4 oviductales confirman la existencia de tejido luteal activo en todos los animales. Si bien no contamos con las mediciones de E en plasma o útero, es probable que los bajos niveles circulantes de P4 sean indicativos de que los animales aún se encuentran bajo un predominio estrogénico, característico de Día 1-3 del ciclo.

Con respecto a las tasas de recuperación embrionaria obtenidas en nuestro estudio, podemos compararlas con un reporte previo en ovinos donde se transfirieron aproximadamente 9 embriones producidos *in vitro*, solamente al oviducto ipsilateral, donde el porcentaje de recuperación al Día 5 de desarrollo fue del 68% (Eyestone y col., 1987), lo cual es considerablemente mayor al obtenido en los animales de nuestro estudio, para el cuerno uterino ipsilateral (43,6%). Es probable que las menores tasas de recuperación de embriones respecto a lo reportado previamente para experimentos similares, o condiciones más fisiológicas (por ejemplo, cuando se colectan embriones luego de una superovulación que es cercana al 80%) (Cordeiro y col., 2003), se deba en parte, a las bajas concentraciones circulantes de esta hormona.

El desarrollo embrionario temprano, antes de la implantación, depende de factores maternos. El fluido uterino está compuesto por proteínas, vitaminas y minerales, y es probable que tales proteínas sean responsables de la transferencia de los nutrientes maternos necesarios al embrión en desarrollo. Entre las proteínas presentes en el fluido uterino podemos destacar a la insulina, IGF1 y leptina (Kaye, 1997; Blache y col., 2000). En nuestro trabajo, encontramos una menor concentración de insulina en el fluido uterino ipsilateral respecto al contralateral al CL. Debido a que se ha reportado la presencia de receptores de insulina en embriones tempranos desde 8 células, con máxima expresión durante el estadio de blastocisto (Heyner y col., 1989; Harvey y Kaye, 1990), podemos sugerir que la menor concentración de insulina encontrada en el fluido uterino ipsilateral se debe a que los embriones alojados en este cuerno tendrían un mayor grado de captación de la insulina, utilizando ese recurso en beneficio de su desarrollo. De hecho, se ha evidenciado que el

embrión internaliza la insulina materna mediante receptores presentes en el embrión por endocitosis (Fleming y Pickering, 1985), mostrando que esta hormona se une específicamente a receptores celulares de embriones en estadio de mórula y blastocito, lo cual, asimismo, es coincidente con la mayor proporción de blastocitos recuperados del cuerno ipsilateral (Tabla 2). Se conoce que la insulina juega un rol importante en la proliferación celular y en la diferenciación durante los estadios primarios del desarrollo en mamíferos. Se han realizado estudios *in vitro* que demuestran que embriones de 2 células, cultivados con insulina, alcanzan un mayor porcentaje de blastocitos respecto a las muestras control (Harvey y Kaye, 1990). Además, la proliferación celular de embriones cultivados con insulina se da exclusivamente en la masa celular interna, es decir, en células del embrión propiamente dicho (Harvey y Kaye, 1990). Durante el estadio de premórula o mórula temprana, los embriones utilizan piruvato como fuente de energía, sin embargo, embriones en estadio de blastocito utilizan glucosa como fuente de energía principal (Pantaleon y Kaye, 1998), necesitando de las acciones de la insulina. En este mismo sentido, la mayor concentración de insulina en el fluido contralateral al CL puede ser indicativo de una menor utilización de esta hormona por parte de los embriones allí presentes, lo que sería consistente con el menor grado de desarrollo encontrado en los embriones de este cuerno (Tabla 2).

Al estudiar la expresión génica de algunos transcritos, se observó que el cuerno uterino ipsilateral presentó mayor expresión de *ERalfa* y tendió a presentar menor expresión de *ADIPOR1* e *IGFBP6* respecto al cuerno contralateral a la ovulación. Es aceptado que los estrógenos estimulan y la progesterona disminuye, la expresión de *ER* y *PR* (Spencer y Bazer, 2004). La baja concentración de P4 circulante en los animales en este estudio, podría explicar en parte, que aún no se haya desencadenado una regulación negativa fuerte del receptor de estrógenos. Además, como mencionamos previamente, la baja concentración circulante de P4 nos sugiere que los animales se encuentran frente a un predominio estrogénico, por lo que una alta concentración de E en el lado ipsilateral sería consistente con un aumento en la expresión de *ERalfa* en el mismo cuerno.

Por otro lado, los cuernos uterinos ipsilaterales al CL tendieron a presentar menor expresión del transcripto *ADIPOR1*. Si bien se acepta que la adiponectina tiene un rol importante en la reproducción debido a que se ha reportado la presencia de *ADIPOR1* y *ADIPOR2* en útero ovino durante la preñez temprana (Sequeira y col., 2016), el rol fisiológico de la adiponectina en la regulación de los procesos reproductivos es poco conocido. Además, la escasa información respecto a la acción de esta hormona y sus receptores limita la interpretación biológica sobre el efecto local del CL para este transcripto. Sin embargo, se ha reportado en algunos tipos celulares que la expresión de *ADIPOR1* declina luego de una exposición con 17β -estradiol (Pfeiler y col., 2008), por tanto considerando que los animales de nuestro estudio podrían encontrarse bajo predominio estrogénico, podemos sugerir que una mayor concentración de E en el lado ipsilateral al CL estaría disminuyendo la expresión de *ADIPOR1* en ese cuerno.

En el mismo sentido, se observó que los cuernos uterinos ipsilaterales al CL tendieron a presentar menor expresión del transcripto de *IGFBP6*. Las IGFBPs son capaces de modular las funciones de IGFs tanto de manera positiva como negativa (Rechler, 1993; Clemmons, 1998), alterando la disponibilidad de la hormona activa y los receptores celulares (Jones y Clemmons, 1995). La IGFBP6 es una glicoproteína O-ligada que se une preferentemente a IGF2 con una afinidad dos veces mayor que IGF1, y se ha demostrado *in vitro*, que altas concentraciones de IGFBP6 inhiben selectivamente las acciones de IGF2, incluyendo proliferación, supervivencia y diferenciación, en una amplia gama de células (Bach, 2015). Como se ha sugerido que IGF2 puede tener un papel predominante en etapas muy tempranas (Día 5) del desarrollo embrionario (Kaye, 1997), la tendencia a la menor expresión de *IGFBP6* en el útero ipsilateral al CL podría ser beneficioso para un desarrollo embrionario exitoso, consistente con las mayores tasas de preñez y la mayor proporción de blastocitos recuperados del cuerno uterino ipsilateral en los animales de este estudio.

Es importante destacar que las muestras fueron obtenidas al Día 6 de desarrollo embrionario, momento en el cual el embrión recién ingresa al útero,

por lo que es probable que los cambios encontrados en el desarrollo embrionario se deban principalmente a las acciones del oviducto más que del útero. Esta puntualización debe ser tomada en cuenta ya que la mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación tardía (en útero) puede haberse determinado en etapas anteriores (en oviducto). Es así que estudiar el ambiente oviductal en su totalidad en estos animales sería de gran relevancia para comprender los mecanismos que subyacen a los efectos de la acción local del CL.

Conclusiones

Existe un efecto local del CL que incide sobre la calidad y desarrollo embrionario temprano según donde se localicen los embriones, en donde aquellos que se desarrollan del lado ipsilateral al CL presentan mejor desarrollo y se presentan en mayor proporción. Esto puede estar asociado principalmente a las acciones de la progesterona en oviducto e insulina en el fluido uterino.

La mayor expresión de *ERalfa* y la tendencia a la menor expresión de *ADIPOR1* en el cuerno uterino ipsilateral podría deberse a la presencia de un predominio estrógeno en los animales de este estudio. La tendencia a la menor expresión de *IGFBP6* en el cuerno uterino ipsilateral al CL podría estar asociado con un mejor desarrollo embrionario en ese cuerno.

Implicancias de la tesis

La producción *in vitro* de embriones tiene un papel fundamental en investigación científica para el estudio de la reproducción en rumiantes, y es un modelo de gran alcance para el estudio de la fertilidad y desarrollo en humanos (Chohan y Hunter, 2004; Hasler, 2003; Hasler, 2006). El estudio sobre las dinámicas de desarrollo de los embriones, es de gran importancia para lograr una mejora en la eficiencia reproductiva, preservación de las especies animales genéticamente superiores y en riesgo de extinción, entre otras. Sin embargo, estos procedimientos *in vitro*, siguen siendo sub-utilizados en la industria ganadera. Si bien el desarrollo de la técnica de transferencia de embriones, ha adquirido mucho peso en el último tiempo, aún quedan muchos aspectos a

mejorar, ya que se conoce que la recuperación de embriones viables luego de una transferencia embrionaria es del 30% aproximadamente. El modelo ovino, es un excelente modelo para estudiar las técnicas reproductivas en humanos, ya que los blastocistos de ambas especies presentan un tamaño similar y los embriones comienzan a expresar su genoma en etapas similares del desarrollo. Por lo que estos resultados podrán contribuir a mejorar las estrategias para aumentar las tasas de embarazo en las mujeres luego de una transferencia embrionaria.

REFERENCIAS

- Astessiano, A. L., Pérez-Clariget, R., Quintans, G., Soca, P., Carriquiry, M. (2012). Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(3), 535-544.
- Ashworth, C.J. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livestock Production Science* 44, 99-105.
- Azzarini, M. (2002). Potencial reproductivo de los ovinos. In 'X Congreso Latinoamericano de Buiatría'. Paysandú, Uruguay pp. 123-130.
- Bach, L. A. (2015). Endothelial cells and the IGF system. *Journal of Molecular Endocrinology*, 54(1), R1-R13.
- Bauersachs, S., Blum, H., Mallokm, S., Wenigerkind, H., Rief, S., Prella, K., Wolf, E. (2003). Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomic approach. *Biology of Reproduction* 68 1170-1177.
- Bazer, F. W. (2013). Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 23.
- Blache, D., Tellam, R. L., Chagas, L. M., Blackberry, M. A., Vercoe, P. E., Martin, G. B. (2000). Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *Journal of Endocrinology*, 165(3), 625-637.
- Bonnin, P., Huynh, L., L'Haridon, R., Chene, N., Martal, J. (1999). Transport of uterine PGF2 α to the ovaries by systemic circulation and local lymphovenous–arterial diffusion during luteolysis in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116(1), 199-210.

Buhi, W. C., Alvarez, I. M., Kouba, A. J. (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 52, 285-300.

Buhi, W. C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction*, 123(3), 355-362.

Caminos, J. E., Nogueiras, R., Gallego, R., Bravo, S., Tovar, S., García-Caballero, T., Casanueva FF., Diéguez, C. (2005). Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(7), 4276-4286.

Carriquiry, M., Weber, W. J., Fahrenkrug, S. C., Crooker, B. A. (2009). Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4889-4900.

Chen, Y., Green, J. A., Antoniou, E., Ealy, A. D., Mathialagan, N., Walker, A. M., Avelle, M. P., Rosenfeld, C. S., Hearne, L. B., Roberts, R. M. (2006). Effect of interferon- τ administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*, 147(5), 2127-2137.

Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 3–22.

Chohan, K. R., Hunter, A. G. (2004). *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology*, 61(2), 373-380.

Clemmons, D. R. (1998). Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 140(1), 19-24.

Cordeiro, M. F., Lima-Verde, J. B., Lopes-Júnior, E. S., Teixeira, D. I. A., Farias, L. N., Salles, H. O., Simplício, A. A., Rodina, D., Freitas, V. J. F. (2003). Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research*, 49(1), 19-23.

Crowe, M. A., Mullen, M. P. (2013). Regulation and Function of Gonadotropins Throughout the Bovine Oestrous Cycle. In Gonadotropin. InTech.

de Brun, V., Abecia, J.A., Fernández-Foren, A., Carriquiry, M., Forcada, F., Vazquez, I., Meikle, A., Sosa, C. (2013). Undernutrition and laterality of the corpus luteum affects gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes. Spanish Journal of Agricultural Research 11, 989–996

de Brun, V., Meikle, A., Casal, A., Sequeira, M., Contreras-Solís, I., Carriquiry, M., Forcada, F., Sosa, C., Abecia, J.A. (2015). Periconceptional undernutrition modifies endocrine profiles and hepatic gene expression in sheep. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 99(4), 710-718.

Del Campo, M.R., Rowe, R.F., French, L.R., Ginther, O.J. (1977). Unilateral relationship of embryos and the corpus luteum in cattle. Biology of Reproduction 16, 580-585.

Downing, J. A., Joss, J., Connell, P., Scaramuzzi, R. J. (1995). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. Journal of Reproduction and Fertility, 103(1), 137-145.

Einer-Jensen, N., McCracken, J.A. (1981). The transfer of progesterone in the ovarian vascular pedicle of the sheep. Endocrinology 109, 685-90.

Eyestone, W. H., Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L., Gilligan, B. G., First, N. L. (1987). Culture of one-and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. Theriogenology, 28(1), 1-7.

Fernández-Foren, A., Abecia, J.A., Vázquez, M.I., Forcada, F., Sartore, I., Carriquiry, M., Meikle, A., Sosa, C. (2011). Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. ITEA 170, 1-15.

Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., Kenny, D. A., Diskin, M. G., Patton, J., Murphy, J. J., Wathes, D. C. (2008). Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(1), 31-44.

Fleming, T. P., Pickering, S. J. (1985). Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *Development*, 89(1), 175-208.

Gandolfi, F., Brevini, T. A., Richardson, L., Brown, C. R., Moor, R. M. (1989). Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development*, 106(2), 303-312.

Gardner, H. G., Kaye, R. L. (1991). Insulin stimulates mitosis and morphological development in preimplantation mouse embryos. *Reproduction Fertility and Development*, 3, 457-461.

Goff, A.K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 133-9.

González, R. R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A., Simon, C. (2000). Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(12), 4883-4888.

Goodman, R. L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp. 659-709.

Graham, J. D., Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews*, 18(4), 502-519.

Hafez, E. S. E., Tsutsumi, Y. (1996). Changes in endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *Developmental Dynamics*, 118(1), 249-281.

Harvey, M. B., Kaye, P. L. (1990). Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts *in vitro*. *Development*, 110(3), 963-967.

Hasler, J. F. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal reproduction science*, 79(3), 245-264.

Hasler, J. F. (2006). The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology*, 65(1), 4-16.

Heyner, S., Rao, L. V., Jarett, L., Smith, R. M. (1989). Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Developmental biology*, 134(1), 48-58.

Hug, C., Wang, J., Ahmad, N. S., Bogan, J. S., Tsao, T. S., Lodish, H. F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), 10308-10313.

Hunter, M. G., Southee, J. A. (1987). Treatment with progesterone affects follicular steroidogenesis in anoestrous ewes. *Animal Reproduction Science*, 14(4), 273-279.

IETS (International Embryo Transfer Society), (2010). Manual. 4th Edition.

Jones, J. I., Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine reviews*, 16(1), 3-34

Kasimanickam, R.K., (2011). Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin concentrations, and mRNA expression of PPAR γ and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology* 76(3):482-91.

Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A., Tanaka, T. (2002). Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology* 143, 1922-31.

Kaye P.L. (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Reviews of Reproduction*, 2, 121-127.

Keller, M.L., Roberts, A.J., Seidel, G.E. (1998). Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in the uterus and conceptus during early conceptus elongation in cattle. *Biology of Reproduction* 59(3), 632-42.

Killian, G. J. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal reproduction science*, 82, 141-153.

Kohl, B. A., Deutschman, C. S. (2006). The inflammatory response to surgery and trauma. *Current opinion in critical care*, 12(4), 325-332.

Lawson, R. A. S., Cahill, L. P. (1983). Modification of the embryo–maternal relationship in ewes by progesterone treatment early in the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 67(2), 473-475.

Leese, H. J. (2005). Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reproduction, Fertility and Development*, 17(3), 387-391.

Leese, H. J., Tay, J. I., Reischl, J., & Downing, S. J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*, 121(3), 339-346.

Ley N° 19167. Regulación de las técnicas de reproducción humana asistida (2013)

Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Maillo, V., Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., Rizos, D. (2016). Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, 86(1), 443-450.

Martal, J., Chene, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., L'haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M., Chaouat, G. (1997). Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development* 9, 355-80.

Menchaca, A., Barrera, N., dos Santos Neto, P. C., Cuadro, F., Crispo, M. (2016). Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. *Animal Reproduction*, 13(3), 273-278.

Menchaca, A., Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 16(4), 403-13.

Michalakis, K. G., Segars, J. H. (2010). The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertility and sterility*, 94(6), 1949-1957.

Moschos, S., Chan, J.L., Mantzoros, C.S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertility and Sterility* 77, 433-44.

Murray, M. K. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biology of Reproduction*, 53(3), 653-663.

Niemann, H., Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53(1), 21-34.

Niswender, G.D., Nett, T.M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimate species. In 'Physiol Reprod'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 781-816. (Raven Press: New York).

Norwitz, E. R., Schust, D. J., Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1400-1408.

Pantaleon, M., Kaye, P. L. (1998). Glucose transporters in preimplantation development. *Reviews of Reproduction*, 3(2), 77-81.

Paramio, M. T. (2010). In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, 89(2), 144-148.

Pfeiler, G. H., Buechler, C., Neumeier, M., Schäffler, A., Schmitz, G., Ortmann, O., Treeck, O. (2008). Adiponectin effects on human breast cancer cells are dependent on 17- β estradiol. *Oncology Reports*, 19(3), 787-793.

Pflaffl, M.W. (2009). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.

Pinotti, L., Rosi, F. (2006). Leptin in bovine colostrum and milk. *Hormone and Metabolic Research*, 38(02), 89-93.

Raddatz, J., Elias, A., Whisnant, C. (2008). Measurements of Adiponectin in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* 86.

Rechler, M. M. (1993). Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitamins & Hormones*, 47, 1-114.

Reynolds, T.S., Stevenson, K.R., Wathes, D.C. (1997). Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during earlyplacental development in the ewe. *Endocrinology* 138, 886-97.

Roche, J.F., Bolandl, M.P., Mcgeady, T.A. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Veterinary Record*.109, 401-404.

Rodnight, R., Zamani, R., Tweedale, A. (1988). An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Neuroscience Methods*. 24(1), 27-38.

Rutledge, R.G and Cote, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* 31, e93.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (45), 26746-9.

Sequeira, M., Pain, S. J., de Brun, V., Meikle, A., Kenyon, P. R., Blair, H. T. (2016). Gestation-related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation Day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology*, 86(6), 1557-1565.

Smith, M. S., Freeman, M. E., Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy *Endocrinology*, 96(1), 219-226.

Sosa, C., Abecia, J.A., Forcada, F., Viñoles, C., Tasende, C., Valares, J.A., Palacin, I., Martin, G.B., Meikle, A. (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 18,447-458.

Sosa, C., Abecia, J.A., Carriquiry, M., Forcada, F., Martin, G.B., Palacin, I., Meikle, A. (2009). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 36,13-23.

Sosa, C., Carriquiry, M., Chalar, C., Crespi, D., Sanguinetti, C., Cavestany, D., Meikle, A., (2010). Endometrial expression of leptin receptor and members of the growth hormone-Insulin-like growth factor system throughout the estrous cycle in heifers. *Animal Reproduction Science*, 122 (3-4):208-14.

Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Bazer, F.W. (2004a). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 537-50.

Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C. (2004b). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128, 657-68.

Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C. (2007). Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. Society of Reproduction and Fertility supplement, 64, 379-396.

Spencer, T.E., Bazer, F.W. (2004). Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. Journal of Animal Science, 82(E. Suppl.): E4-E13.

Stevenson, K.R., Gilmour, R.S., Wathes, D.C. (1994). Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and -II messenger ribonucleic acid and type 1 IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. Endocrinology 134, 1655-1664.

Stevenson, K.R., Wathes, D.C. (1996). Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. Journal of Reproduction and Fertility 108, 31-40.

Takahashi, H., Haneda, S., Kayano, M., Matsui, M. (2016). Differences in progesterone concentrations and mRNA expressions of progesterone receptors in bovine endometrial tissue between the uterine horns ipsilateral and contralateral to the corpus luteum. Journal of Veterinary Medical Science, 78(4), 613-618.

Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. Endocrine Reviews 15, 80-101.

Viñoles, C., Forsberg, M., Martin, G. B., Cajarville, C., Meikle, A. (2003). Short-term nutritional supplementation of Corriedale ewes: responses in ovulation rate, follicle development and reproductive hormones. Reproduction, 129, 299-309.

Walker, S. K., Hartwich, K. M., Seamark, R. F. (1996). The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. Theriogenology, 45(1), 111-120.

Wathes, D.C., Reynolds, T.S., Robinson, R.S., Stevenson, K.R. (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *Journal of Dairy Science* 81, 1778-89.

Weems, C.W., Weems, Y.C., Lee, C.N., Vicent, D.L. (1989). Progesterone in uterine and arterial tissue and in jugular and uterine venous plasma of sheep. *Biology of Reproduction* 49, 1-6.

Wijayagunawardane, M.P.B., Miyamoto, A., Cerbito, W.A., Acosta, T.J., Takagi, M., Sato, K. (1997). Local distribution of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology* 49, 607-618.

Wintenberger-Torres, S., Flechon, J.E. (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *Journal of Anatomy*, 118, 143-53.

Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., et al., (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine*, 13(3), 332-339.